

Anggur buah



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	2
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji	3
10 Pengemasan.....	3
11 Penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji anggur buah	4
Bibliografi.....	35

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) ini merupakan revisi dari SNI 01-4019-1996, *Anggur buah*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan olahan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan produk industri anggur buah.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal – hal yang tertera dalam :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No.5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No.36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No.28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Keputusan Presiden Republik Indonesia No.3/1997 tentang Pengawasan dan Pengendalian Minuman Beralkohol.
8. Peraturan Menteri Perindustrian dan Perdagangan RI No. 359 tahun 1997 Tentang Pengawasan dan Pengendalian Produk, Impor, Pengedaran dan Penjualan Minuman Beralkohol.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No.75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.
10. Peraturan Direktur Jenderal Industri Agro No. 30/IA/Per/12/2011, tentang Petunjuk Teknis Penilaian Penerapan Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik .
11. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
12. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.
13. Peraturan Menteri Perdagangan No. 53/M-DAG/PER/12/2010 tentang Perubahan atas Peraturan Menteri Perdagangan Nomor 43/M-DAG/PER/9/2009 tentang Ketentuan Pengadaan, Pengedaran, Penjualan, Pengawasan dan Pengendalian Minuman Beralkohol .

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 67-04-S1, *Minuman dan Tembakau*, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 13 Desember 2011 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 13 Juli 2012 sampai dengan tanggal 12 Oktober 2012 dengan hasil akhir RASNI.

Anggur buah

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, cara uji, pengemasan dan penandaan anggur buah.

2 Acuan normatif

Untuk acuan normatif tidak bertanggal, edisi terakhir yang digunakan (termasuk revisi dan amandemennya).

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

anggur buah

minuman beralkohol hasil fermentasi buah-buahan selain buah anggur, apel, pir, serealiala dan hasil pertanian lainnya dengan atau tanpa bahan pangan lain dan/atau bahan tambahan pangan yang diizinkan sesuai ketentuan yang berlaku

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

- Buah selain buah anggur, apel, pir, serealiala dan hasil pertanian lainnya
- Air

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diizinkan untuk anggur buah sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk anggur buah sesuai dengan ketentuan yang berlaku

5 Syarat mutu

Syarat mutu anggur buah sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu anggur buah

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1.	Keadaan:		
1.1	Bau	-	normal/khas
1.2	Rasa	-	normal/khas
2.	Etanol	% v/v	5,1 - 20,0
3.	Metanol	% v/v	maks. 0,01
4.	Keasaman titrasi (dihitung sebagai asam sitrat)	%	maks. 1
5.	Cemaran logam		
5.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,2
5.2	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
5.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0 (250,0 *)
5.4	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
6.	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,2
7.	Cemaran mikroba :		
7.1	Angka Lempeng Total (ALT)	koloni/mL	maks. 2×10^2
7.2	<i>Coliform</i>	APM/mL	maks. 20
7.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/mL	< 3
7.4	<i>Salmonella sp.</i>	-	negatif / 25 mL
7.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	negatif / mL
7.6	Kapang dan Khamir	koloni/mL	maks. 1×10^2
CATATAN : * untuk yang dikemas dalam kaleng			

6 Pengambilan contoh

Pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk Anggur buah seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
- Cara uji etanol sesuai Lampiran A.3
- Cara uji metanol sesuai Lampiran A.4
- Cara uji keasaman sesuai Lampiran A.5
- Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.6
 - Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.6.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.6.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.6.3
- Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.7
- Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.8

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat tidak dipengaruhi dan mempengaruhi isi, aman dalam penyimpanan dan pengangkutan.

11 Penandaan

Penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A
(normatif)
Cara uji anggur buah

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik dan analisis kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Homogenkan contoh kemudian buka kemasan anggur buah dan ambil contoh secara aseptik sesuai dengan kebutuhan kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan anggur buah dan ambil contoh anggur buah

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji kimia

Homogenkan contoh kemudian buka kemasan anggur buah dan ambil contoh sesuai dengan kebutuhan kemudian tempatkan dalam botol Erlenmeyer yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya;
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan “ normal “, dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan “ tidak normal “.

A.2.2 Rasa

A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan dirasakan dengan indera pengecap (lidah);
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal" ; dan
- jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.3 Etanol

A.3.1 Prinsip

Membandingkan volume destilat contoh dan air pada suhu 20 °C untuk mengetahui berat jenisnya. Dari daftar berat jenis yang ada dalam tabel akan didapatkan kadar alkohol yang terkandung dalam contoh.

A.3.2 Peralatan

- Piknometer 100 mL terkalibrasi;
- Peralatan distilasi;
- Pemanas listrik atau gas;
- Thermostat dengan pengatur suhu;
- Pipa kapiler;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pipet volume 100 mL terkalibrasi.

A.3.3 Cara kerja

- Bilas piknometer kosong dengan aseton biarkan hingga benar benar kering;
- Biarkan piknometer kosong pada suhu ruang, tutup dan timbang;
- Isi piknometer bersih menggunakan akuades tutup dan rendam dalam thermostat dengan suhu 20 °C dengan garis batas piknometer terendam air;
- Setelah 30 menit buka piknometer tepatkan isi piknometer sampai tanda dengan air menggunakan pipa kapiler. Keringkan permukaan leher piknometer bagian dalam menggunakan gulungan kertas saring, biarkan pada suhu ruang selama 15 menit;
- Ambil piknometer, keringkan biarkan selama 15 menit dan timbang;
- Pipet 100 mL contoh anggur buah ke dalam labu destilasi 300 mL - 500 mL, tambahkan 50 mL air suling dan destilasi;
- Tampung destilatnya ke dalam piknometer tutup dan rendam dalam thermostat dengan suhu 20 °C dengan garis batas piknometer terendam air;
- Setelah 30 menit buka piknometer tepatkan isi piknometer sampai tanda dengan air menggunakan pipa kapiler. Keringkan permukaan leher piknometer bagian dalam menggunakan gulungan kertas saring, biarkan pada suhu ruang selama 15 menit;
- Ambil piknometer, keringkan biarkan selama 15 menit dan timbang;
- Hitung berat jenis alkohol (20/20 °C) dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Berat jenis} = \frac{S}{W}$$

Keterangan:

S adalah berat contoh uji

W adalah berat air

A.3.4 Perhitungan

% etanol diperoleh dengan membandingkan dengan Tabel A.1

Tabel A.1 – Hubungan antara kadar alkohol (% isi) pada 15,56 °C dengan berat jenis pada berbagai suhu

Berat Jenis	15,56 15,56	20/20	22/22	24/24	25/25	26/26	28/28	30/30	32/32	34/34	35/35	36/36
1.000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.9999	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
98	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13
97	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20
96	.27	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26
95	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33
94	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40
93	.47	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46
92	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53
91	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60
90	.67	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66
89	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73
88	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.79	.79	.79	.79	.79	.79
87	.87	.87	.87	.87	.87	.87	.86	.86	.86	.86	.86	.86
86	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93
85	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
84	.07	.07	.07	.07	.07	.07	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
83	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13
82	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.19	.19	.19	.19	.19
81	.27	.27	.27	.27	.27	.27	.26	.26	.26	.26	.26	.26
80	.34	.34	.34	.34	.34	.33	.33	.32	.32	.32	.32	.32
79	.41	.41	.41	.40	.40	.40	.40	.39	.39	.39	.39	.39
78	.48	.48	.48	.47	.47	.47	.47	.46	.46	.46	.46	.46
77	.54	.54	.54	.54	.54	.53	.53	.53	.53	.53	.52	.52
76	.61	.61	.61	.60	.60	.60	.60	.59	.59	.59	.59	.59
75	.68	.68	.68	.67	.67	.67	.67	.66	.66	.66	.66	.66
74	.75	.75	.75	.74	.74	.73	.73	.73	.73	.72	.72	.72
73	.82	.81	.81	.81	.81	.80	.80	.80	.80	.79	.79	.79
72	.88	.88	.88	.87	.87	.87	.86	.86	.86	.85	.85	.85
71	.95	.95	.95	.94	.94	.94	.93	.93	.93	.92	.92	.92
70	2.02	2.02	2.02	2.01	2.01	2.01	2.00	2.00	2.00	.99	.99	.99
69	.09	.09	.09	.08	.08	.08	.07	.07	.06	2.05	2.05	2.05
68	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.14	.14	.13	.12	.12	.12
67	.23	.22	.22	.21	.21	.21	.20	.20	.20	.19	.19	.19
66	.30	.29	.29	.28	0.28	0.28	.27	.27	.27	.26	.26	.26
65	.37	.36	.36	.35	.35	.35	.34	.34	.33	0.32	.32	.32
64	.43	.43	.43	.42	.42	.42	.41	.41	.40	.39	.39	.39
63	.50	.50	.50	.49	.49	.49	.48	.48	.47	.46	.46	.46
62	.57	.57	.57	.56	.56	.56	.55	.54	.54	.53	.53	.53
61	.64	.64	.64	.63	.63	.63	.62	.61	.60	.60	.59	.59
60	.71	.70	.70	.70	.70	.70	.69	.68	.67	.67	.66	.66
59	.78	.77	.77	.77	.77	.77	.76	.75	.74	.74	.73	.73
58	.85	.84	.84	.83	.83	.83	.82	.82	.81	.81	.80	.80
57	.92	.91	.91	.90	.90	.90	.89	.88	.87	.87	.86	.86
56	.99	.98	.98	.97	.97	.97	.96	.95	.94	.94	.93	.93
55	3.06	3.05	3.05	3.04	3.04	3.04	3.03	3.02	3.01	3.01	3.00	3.00
54	.13	.12	.12	.11	.11	.11	.10	.09	.08	.08	.07	.07
53	.20	.19	.19	.18	.18	.18	.17	.16	.15	.15	.14	.14
52	.27	.26	.26	.25	.25	.25	.24	.23	.22	.22	.21	.21
51	.34	.33	.33	.32	.32	.32	.31	.30	.29	.28	.27	.27

Tabel A.1 – Lanjutan

Berat Jenis	15,56 15,56	20/20	22/22	24/24	25/25	26/26	28/28	30/30	32/32	34/34	35/35	36/36
0.9950	.41	.40	.40	.39	.39	.39	.38	.37	.36	.35	.34	.34
49	.49	.47	.47	.46	.46	.46	.45	.44	.43	.42	.41	.41
48	.56	.54	.54	.53	.53	.53	.52	.51	.50	.49	.48	.48
47	.63	.61	.61	.60	.60	.60	.59	.58	.57	.56	.55	.55
46	.70	.68	.68	.67	.67	.67	.66	.65	.64	.63	.62	.62
45	.77	.76	.75	.74	.74	.74	.73	.72	.70	.69	.68	.68
44	.84	.83	.82	.81	.81	.81	.79	.78	.77	.76	.75	.75
43	.91	.90	.89	.88	.88	.88	.86	.85	.84	.83	.82	.82
42	.99	.97	.96	.95	.95	.95	.93	.92	.91	.90	.89	.89
41	4.06	4.04	4.03	4.02	4.02	4.02	4.00	.99	.98	.97	.96	.96
40	.13	.11	.10	.10	.09	.09	.07	4.06	4.05	4.04	4.03	4.03
39	.20	.18	.17	.17	.16	.16	.14	.13	.12	.11	.10	.10
38	.28	.26	.25	.25	.24	.23	.21	.20	.19	.18	.17	.17
37	.35	.33	.32	.32	.31	.30	.28	.27	.26	.25	.24	.24
36	.42	.40	.39	.39	.38	.37	.36	.35	.33	.32	.31	.30
35	.50	.48	.47	.46	.45	.44	.43	.42	.40	.39	.38	.37
34	.57	.55	.54	.53	.52	.51	.50	.49	.47	.46	.45	.44
32	.71	.69	.68	.67	.66	.65	.64	.63	.61	.60	.59	.58
31	.79	.77	.76	.75	.74	.73	.72	.70	.68	.67	.66	.65
30	4.86	4.84	4.83	4.82	4.81	4.80	4.79	4.77	4.75	4.74	4.73	4.72
29	.93	.91	.90	.89	.88	.87	.86	.84	.82	.81	.80	.79
28	5.01	.98	.97	.96	.95	.94	.93	.91	.89	.88	.87	.86
27	.08	5.06	5.04	5.03	5.02	5.01	5.00	.98	.96	.95	.94	.93
26	.16	.13	.12	.11	.10	.09	.07	5.05	5.03	5.02	5.01	5.00
25	.23	.21	.19	.18	.17	.16	.14	.12	.10	.09	.08	.07
24	.31	.28	.26	.25	.24	.23	.21	.20	.18	.16	.15	.14
23	.39	.36	.34	.33	.32	.31	.29	.27	.25	.23	.22	.21
22	.46	.43	.41	.40	.39	.38	.36	.34	.32	.30	.29	.28
21	.54	.51	.49	.48	.47	.46	.44	.42	.40	.38	.37	.37
20	.61	.58	.56	.55	.54	.53	.51	.49	.47	.45	.44	.43
19	.69	.66	.64	.62	.61	.60	.58	.56	.54	.52	.51	.50
18	.77	.73	.71	.70	.69	.68	.66	.64	.62	.59	.58	.57
17	.84	.81	.79	.77	.76	.75	.73	.71	.69	.66	.65	.64
16	.92	.88	.86	.85	.84	.83	.80	.78	.76	.74	.73	.72
15	.99	.96	.94	.92	.91	.90	.87	.85	.83	.81	.80	.79
14	6.07	6.03	6.01	6.00	.99	.98	.95	.93	.91	.88	.87	.86
13	.15	.11	.09	.07	6.06	6.05	6.02	6.00	.98	.95	.94	.93
12	.23	.18	.16	.15	.14	.13	.10	.08	6.05	6.02	6.01	6.00
11	.30	.26	.24	.22	.21	.20	.17	.15	.12	.10	.09	.08
10	.38	.34	.32	.30	.29	.28	.25	.23	.20	.17	.16	.15
09	.46	.41	.39	.37	.36	.35	.32	.30	.28	.25	.24	.23
08	.54	.49	.47	.45	.44	.43	.40	.38	.35	.32	.31	.30
07	.62	.57	.55	.53	.52	.51	.48	.45	.42	.39	.38	.37
06	.70	.65	.63	.60	.59	.58	.55	.53	.50	.47	.46	.45
05	.77	.73	.71	.68	.67	.66	.63	.60	.57	.54	.53	.52
04	.85	.80	.78	.75	.74	.73	.70	.68	.65	.62	.60	.59
03	.93	.88	.86	.83	.82	.81	.78	.75	.72	.69	.68	.67
02	7.01	.96	.93	.90	.89	.88	.85	.83	.80	.77	.75	.74
01	.09	7.04	7.01	.98	.97	.95	.92	.90	.87	.84	.82	.81
00	.17	.12	.09	7.06	7.05	7.03	7.00	.98	.94	.91	.90	.88
0.9899	.25	.19	.16	.13	.12	.10	.07	7.05	7.01	.98	.97	.95
98	.33	.27	.24	.21	.20	.18	.15	.13	.09	7.06	7.04	7.02
97	.41	.35	.32	.29	.28	.26	.23	.21	.17	.14	.12	.10
96	.50	.43	.40	.37	.36	.34	.31	.28	.24	.21	.19	.17
95	.58	.51	.48	.45	.44	.42	.39	.36	.32	.29	.27	.25
94	.66	.59	.56	.53	.52	.50	.47	.44	.40	.36	.34	.32
93	.74	.67	.64	.60	.59	.57	.54	.51	.47	.44	.42	.40
92	.82	.75	.72	.68	.67	.65	.62	.59	.55	.51	.49	.47
91	.90	.82	.79	.76	.75	.73	.70	.66	.62	.59	.57	.55

Tabel A.1 – Lanjutan

Berat Jenis	15,56 15,56	20/20	22/22	24/24	25/25	26/26	28/28	30/30	32/32	34/34	35/35	36/36
0.9890	.98	.90	.87	.84	.83	.81	.78	.74	.70	.66	.64	.62
89	8.07	.98	.95	.92	.91	.89	.86	.82	.78	.74	.72	.70
88	.15	8.06	8.03	8.00	.98	.96	.93	.89	.85	.81	.79	.77
87	.23	.15	.11	.08	8.06	8.04	8.01	.97	.93	.89	.87	.85
86	.32	.23	.19	.16	.14	.12	.09	8.05	8.01	.96	.94	.92
85	.40	.31	.27	.24	.22	.20	.16	.12	.08	8.04	8.02	8.00
84	.48	.39	.35	.32	.30	.28	.24	.20	.16	.11	.09	.07
83	.57	.47	.43	.40	.38	.36	.32	.27	.23	.19	.17	.15
82	.65	.55	.51	.48	.46	.44	.40	.35	.31	.26	.24	.22
81	.73	.63	.59	.56	.54	.52	.48	.43	.39	.34	.32	.30
80	.82	.71	.67	.63	.61	.59	.55	.50	.46	.41	.39	.37
79	.90	.79	.75	.71	.69	.67	.63	.58	.54	.49	.47	.45
78	.98	.88	.84	.79	.77	.75	.71	.66	.61	.56	.54	.52
77	9.07	.96	.92	.87	.85	.83	.78	.73	.69	.64	.62	.60
76	.15	9.04	9.00	.95	.93	.91	.86	.81	.76	.71	.69	.67
75	.24	.13	.08	9.03	9.01	.99	.94	.89	.84	.79	.77	.75
74	.32	.21	.16	.11	.09	9.07	9.02	.96	.91	.86	.84	.82
73	.40	.29	.24	.19	.17	.15	.10	9.04	.99	.94	.92	.90
72	.49	.38	.33	.27	.25	.23	.18	.12	9.07	9.02	.99	.97
71	.57	.46	.41	.35	.33	.31	.26	.20	.15	.10	9.07	9.05
70	.66	.54	.49	.43	.41	.38	.33	.27	.22	.17	.14	.12
69	.74	.62	.57	.51	.49	.46	.41	.35	.30	.25	.22	.19
68	.82	.70	.65	.59	.57	.54	.49	.43	.37	.32	.29	.26
67	.91	.79	.74	.68	.65	.62	.57	.51	.45	.40	.37	.34
66	.99	.87	.82	.76	.73	.70	.65	.59	.53	.47	.44	.41
65	10.08	.95	.90	.84	.81	.78	.72	.66	.60	.54	.51	.48
64	.16	10.03	.98	.92	.89	.86	.80	.74	.68	.62	.59	.56
63	.25	.11	10.06	10.00	.97	.94	.88	.82	.76	.69	.66	.63
62	.33	.20	.14	.08	10.05	10.02	.96	.90	.84	.77	.74	.71
61	.42	.28	.22	.16	.13	.10	10.04	.98	.91	.84	.81	.78

A.4 Metanol

A.4.1 Prinsip

Metanol dioksidasi dengan kalium permanganat menjadi formaldehida. Kelebihan kalium permanganat direaksikan dengan natrium bisulfit, kemudian formaldehida yang terjadi direaksikan dengan asam kromatropat atau garamnya. Warna yang terjadi resapannya (*absorbance*) diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm.

A.4.2 Peralatan

- Alat penyuling;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL;
- Pipet ukur 1 mL, 2 mL, 25 mL;
- Gelas ukur 25 mL;
- Penangas air suhu antara 60 °C sampai 75 °C;
- Penangas es;
- Termometer 100 °C;
- Kuvet 1 cm;
- Spektrofotometer visible.

A.4.3 Pereaksi

- Asam sulfat pekat 95 % – 98 %;
- Natrium bisulfit;

- c) Larutan kalium permanganat;
Larutkan 3,0 g KMnO_4 dan 15,0 mL H_3PO_4 dalam 100 mL H_2O . Larutan ini tahan sebulan
- d) Larutan natrium kromatopat (Natrium 1,8-dihydroxy-naphthalene -3,6- disulfonate)
Larutan 5 % dalam air. Saring jika tidak jernih. Larutan ini tahan seminggu
Jika Absorbansi dari blanko pereaksi $> 0,05$, murnikan pereaksi dengan cara seperti berikut:
Larutkan 10 g asam kromatopat atau garamnya dalam 25 mL H_2O (Tambahkan 2 ml H_2SO_4 dalam larutan air dari garam untuk mengubahnya menjadi asam bebas).
Tambahkan 50 mL methanol, panaskan mencapai titik didih dan saring. Tambahkan 100 mL isopropanol untuk mengendapkan asam kromatopat bebas (Tambahkan lebih banyak isopropanol untuk meningkatkan hasil asam yang dimurnikan)
- e) Larutan baku metanol
Buat larutan standar metanol 0,025 % v/v dalam alkohol 5,5 % v/v.

A.4.4 Cara kerja

- a) Persiapan contoh uji
 - Encerkan atau sesuaikan konsentrasi total alkohol larutan uji menjadi sekitar 5 % - 6 %.
 - Dengan menggunakan 50 mL larutan uji yang telah diencerkan, destilasi , kumpulkan destilat sebanyak 40 mL. Encerkan hingga 50 mL dengan H_2O . (Jika alkohol telah ditentukan sebelumnya, kadar alkohol destilat dapat disesuaikan hingga 5-6% dan digunakan untuk uji ini).
 - Jika terdapat campuran $>0,05\%$, encerkan hingga kadar tersebut menggunakan alkohol 5,5 %. Untuk produk yang mengandung metanol $< 0,05$ %, ukur 200 mL dan tempatkan dalam wadah, tempatkan dalam refluks total selama 15 menit dan secara perlahan destilasi pada laju refluks tinggi ($\geq 20:1$). Kumpulkan 10 mL destilat dan encerkan hingga 160 mL dengan H_2O .
- b) Penentuan kadar
 - Pipet 2 mL larutan KMnO_4 masukkan dalam labu ukur 50 mL. Dinginkan dalam penangas es, tambahkan 1 mL contoh uji yang telah dipersiapkan (A.4.4 a) dan diamkan selama 30 menit dalam penangas es;
 - Hilangkan warna dengan sedikit NaHSO_3 kering;
 - Tambahkan 1 mL larutan asam kromatopat;
 - Tambahkan 15 mL H_2SO_4 secara perlahan dengan pengadukan dan letakkan pada penangas air ($60^\circ\text{C} - 75^\circ\text{C}$) selama 15 menit;
 - Dinginkan, tambahkan H_2O hingga mendekati tanda batas 50 mL, kocok dan encerkan sampai tanda batas dengan H_2O pada suhu ruang;
 - Baca Absorbansi pada 575 nm dengan menggunakan blanko alkohol 5,5 % yang diperlakukan sama;
 - Perlakukan larutan standar methanol yang mengandung 0,025 % v/v dalam 5,5 % alkohol secara bersama-sama dengan perlakuan sama dan baca absorbansinya.

A.4.5 Perhitungan

Metanol dalam contoh uji, % $= (A/A') \times 0,025 \times F$

Keterangan:

F adalah faktor pengenceran dari contoh uji laboratorium

A adalah Absorbansi contoh uji

A' adalah Absorbansi Standar

A.5 Keasaman

A.5.1 Prinsip

Contoh uji dihilangkan CO₂ nya kemudian dititrasi menggunakan larutan NaOH dengan indikator phenolphthalein.

A.5.2 Peralatan

- a) Erlenmeyer;
- b) Pipet ukur 1 mL, 5 mL, 25 mL;
- c) Pemanas;
- d) Buret 25 mL.

A.5.3 Pereaksi

- a) Larutan NaOH 0,1 M;
- b) Larutan indikator phenolphthalein 0,5 %.

A.5.4 Cara Kerja

- a) Hilangkan CO₂ jika ada dalam contoh uji dengan cara masukkan 25 mL contoh uji ke dalam Erlenmeyer panaskan hingga mendidih selama 30 detik, goyang-goyang kemudian dinginkan;
- b) Masukkan 200 mL air panas ke dalam Erlenmeyer 500 mL, tambahkan 1 mL indikator phenolphthalein 0,5 %;
- c) Kemudian masukkan 5 mL contoh uji yang sudah dihilangkan CO₂ nya;
- d) Titrasi dengan larutan NaOH 0,1 M hingga terbentuk warna merah muda.

A.5.5 Perhitungan

Keasaman (g asam sitrat / 100 mL) = mL NaOH × Molaritas NaOH × 0,075 × 100/5 × 0,933

A.6 Cemarkan logam

A.6.1 Timbal (Pb) dan kadmium (Cd)

A.6.1.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan cara dikeringkan dan diabukan pada suhu 450 °C kemudian ditambahkan larutan asam. Analisa dilakukan dengan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.6.1.2 Peralatan

- a) SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda Cd dan Pb;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Pemanas listrik;
- d) Cawan porselen;
- e) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) Penangas air;
- g) Pipet ukur 5 mL, 10 mL dan 25 mL;
- h) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL dan 50 mL terkalibrasi;
- i) Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi particle retention 20 µm -25 µm;
- j) Botol *polypropylene*.

A.6.1.3 Pereaksi

- Air yang didestilasi dua kali atau air bebas logam;
- Asam klorida 6M
Larutkan 500 mL HCl (37 °C w/w) dengan air suling hingga 1 L;
- Asam nitrat pekat (65%);
- Asam nitrat 0,1 M
Larutkan 7 mL HNO₃ 65% dengan air suling hingga 1 L;
- Larutan baku Timbal (Pb)
- Larutkan 1 000 g Pb dengan 7 mL HNO₃ 65% dalam labu ukur 1 000 mL, encerkan dengan air suling hingga tanda batas;
- Larutan baku Kadmium (Cd);
- Larutkan 1 000 g Cd dengan 14 mL air suling dan 7 mL HNO₃ 65 % dalam labu ukur 1 000 ml, encerkan dengan air suling hingga tanda batas;
- Larutan baku kerja
Larutkan larutan baku dengan HNO₃ 0,1 M sesuai dengan batas linieritas kurva untuk masing-masing unsur.

A.6.1.4 Cara kerja

- Timbang 10 g – 20 g contoh uji dengan teliti dalam cawan porselen;
- keringkan dalam oven atau penangas air atau hot plate pada suhu 100 °C sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- lanjutkan dengan menempatkan cawan porselen dalam tanur dengan suhu (200 – 250) °C dan kemudian secara perlahan naikan suhu hingga 450 °C, biarkan selama kurang lebih 8 jam atau semalam;
- ambil cawan porselen kemudian dinginkan, tambahkan 1 mL - 3 mL air suling kemudian uapkan dengan penangas air atau pemanas listrik;
- masukkan cawan porselen dalam tanur kembali dan panaskan pada suhu 450 °C selama 1 jam - 2 jam atau lebih, ulangi hingga pengabuan sempurna (abu menjadi putih);
- tambahkan 5 mL HCl 6 M, kemudian keringkan asam dengan penangas air atau pemanas listrik;
- larutkan residu dengan 10-20 mL HNO₃ 0,1 M dan masukkan dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling, saring larutan menggunakan kertas saring ke dalam botol *polypropylene*;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorban larutan baku kerja, larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam sebagai sumbu X dan absorban sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi dan hitung kandungan logam dalam contoh.

A.6.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah kandungan logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam µg/mL

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mL

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram

A.6.2 Timah (Sn)

A.6.2.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan HNO_3 dan HCl . Larutan KCl ditambahkan pada contoh uji dan larutan baku untuk mengurangi gangguan. Sn ditentukan dengan menggunakan SSA pada panjang gelombang 235.5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.6.2.2 Peralatan

- SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda Sn, dan burner $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$;
- Pemanas listrik;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas air;
- Pipet ukur 25 mL;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL dan 50 mL terkalibrasi;
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi retensi partikel 20 μm -25 μm ;
- Botol polipropilena;
- Erlenmeyer 250 mL.

A.6.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida 10 mg K/mL
Larutkan 1.91 g KCl dan larutkan hingga 100 mL dengan air suling;
- Asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- Asam klorida pekat, HCl pekat;
- Larutan baku timah 1 mg Sn/mL
Larutkan 1.000 Sn dalam 200 mL HCl pekat dan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling hingga 1 L;
- Larutan baku kerja 0 μg Sn/mL; 50 μg Sn/mL; 100 μg Sn/mL; 150 μg Sn/mL; dan 200 μg Sn/mL.
Pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl kedalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, dan 20 mL larutan baku Sn, encerkan dengan air suling sampai tanda batas.

A.6.2.4 Cara kerja

- Timbang dengan teliti 30 g – 40 g contoh uji ke dalam Erlenmeyer 250 mL;
- tambahkan 30 mL HNO_3 pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan hingga sisa volume 3 mL - 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuk arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas, tambahkan 25 mL HCl pekat, panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling;
- Tambahkan 1,0 mL KCl dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorban larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam sebagai sumbu X dan absorban sebagai sumbu Y;

- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi dan hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.6.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah kandungan timah dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam $\mu\text{g/mL}$

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mL

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram

A.6.3 Merkuri (Hg)

A.6.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorban Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm.

A.6.3.2 Peralatan

- SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda Hg dan generator uap dingin (MVU);
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Pendingin;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur 25 mL.

A.6.3.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H_2SO_4 9M;
- Asam nitrat HNO_3 7 M;
- Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 ;
- Larutan natrium molibdat 2 %;
- Larutan pereduksi
Campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda batas;
- Larutan NaBH_4
Larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL;
- Larutan pengencer
Masukkan 300 mL sampai 500 mL air suling ke dalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 mL H_2SO_4 , encerkan dengan air suling sampai tanda batas, kocok;
- Larutan baku Hg 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Larutkan 0,135 4 g HgCl_2 dengan air suling dalam labu ukur 100 mL, encerkan sampai tanda batas;
- Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$
Pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok;

k) Larutan baku kerja

Pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL ; 2 mL dan 3 mL larutan baku 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 µg/mL; 0,005 µg/mL; 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL dan 0,03 µg/mL Hg.

A.6.3.4 Cara kerja

- Timbang 5 g contoh dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H₂SO₄ 9 M, 20 mL HNO₃ 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 % dan 5 butir sampai 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan diatas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran HNO₃ – HClO₄ (1:1) melalui pendingin
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih, lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak tiga kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh dan larutan blanko pada alat MVU
- baca absorban larutan baku kerja, larutan contoh dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam sebagai sumbu X dan absorban sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi dan hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.6.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

C adalah kandungan merkuri dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam µg/mL

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mL

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram

fp adalah faktor pengenceran

A.7 Cemarkan Arsen**A.7.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As⁵⁺ direduksi dengan KI menjadi As³⁺ dan direaksikan dengan NaBH₄ atau SnCl₂ sehingga terbentuk AsH₃ yang

kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang 193,7 nm.

A.7.2 Peralatan

- SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap dingin hidrida (HVG);
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Labu Kjeldahl 250 mL;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 50 mL;
- Pipet volume 25 mL;
- Pipet ukur , 1 mL ,2 mL, 5 mL dan 10 mL;
- Microwave digester;
- Labu borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C.

A.7.3 Peraksi

- Asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- Asam sulfat pekat H_2SO_4 pekat;
- Asam perklorat , HClO_4 70%;
- Asam Klorida 8 M
Larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda batas;
- Larutan Magnesium nitrat, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL
Larutkan 3,75 MgO dengan 30 mL air suling, secara perlahan tambahkan HNO_3 untuk melarutkan (kurang lebih 10 mL), dinginkan dan encerkan sampai 50 mL dengan air suling;
- Larutan KI 20%
Timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- Larutan borohidrida NaBH_4
Larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL;
- Larutan baku Arsen (As)
Larutkan 1,320 g As_2O_3 dalam volume minimal NaOH 20% masukkan dalam labu ukur 1 L asamkan dengan HCl (1+1) dan larutkan dengan air suling sampai tanda batas;
- Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$
Pipet 10 mL larutan baku dalam labu ukur 100 mL dan larutkan dengan air suling sampai tanda batas;
- Larutan baku 10 $\mu\text{g/mL}$
Pipet 10 mL larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ dalam labu ukur 100 mL dan larutkan dengan air suling sampai tanda batas;
- Larutan baku kerja As, 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,3 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; dan 0,5 $\mu\text{g/mL}$
Pipet 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL dan 5 mL Larutan baku 10 $\mu\text{g/mL}$ masukkan dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda batas.

A.7.4 Cara kerja

A.7.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g sampai 10 g contoh ke dalam labu Kjeldahl , tambahkan 5 mL sampai 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;

- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL ammonium oksalat jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan , pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- g) pipet 25 mL larutan di atas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorban larutan baku kerja, larutan contoh dan larutan blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam sebagai sumbu X dan absorban sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi dan hitung kandungan As dalam contoh;
- m) hitung kandungan As dalam contoh.

A.7.4.2 Destruksi menggunakan microwave atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 0,5 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) Masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai petunjuk pemakaian alat
- c) Setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) Pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) Dinginkan , larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) Siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat
- g) Tuangkan larutan baku kerja As, larutan contoh, larutan blanko, nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) Baca absorban larutan baku kerja, larutan contoh dan larutan blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam sebagai sumbu X dan absorban sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi dan hitung kandungan As dalam contoh;
- k) Hitung kandungan As dalam contoh.

A.7.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

C adalah kandungan Arsen dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam $\mu\text{g/mL}$

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mL

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram

fp adalah faktor pengenceran

A.8 Cemarkan mikroba

A.8.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk angka lempeng total, bakteri *Coliform*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan kapang dan khamir.

A.8.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.8.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi dilengkapi dengan *bulb* atau *pipettor*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

A.8.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- air suling 500 mL

Atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan tabung reaksi sebanyak 9 mL, kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.8.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.8.2 Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)

A.8.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu (35 ± 1) °C.

A.8.2.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi.
- Otoklaf;
- Penangas air bersirkulasi (45 ± 1) °C
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Botol pengencer 160 mL, terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulp* atau *pipettor*; dan
- Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

A.8.2.3 Pembenihan dan pengencer

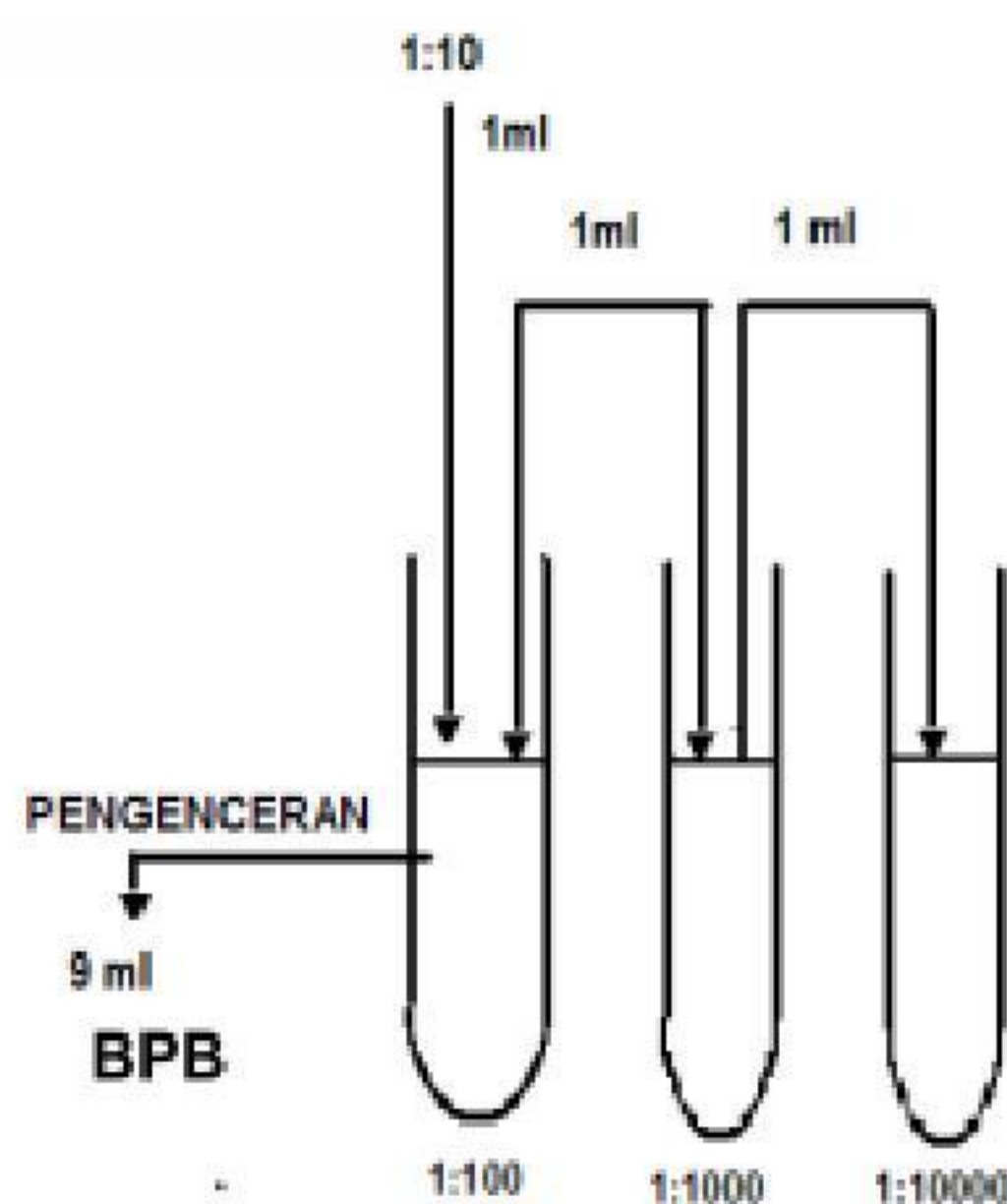
Plate count agar (PCA)

- <i>tryptone</i>	5 g
- <i>yeast extract</i>	2,5 g
- glukosa	1 g
- agar	15 g
- air suling	1 000 mL

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.8.2.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;
- pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran (F) 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu (45 ± 1) °C ke dalam masing-masing cawan petri;
- goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam; dan
- catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB)

A.8.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/gr) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.8.2.6 Pernyataan hasil

A.8.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

$$\text{ALT} = \frac{\begin{array}{cc} 10^{-2} & 10^{-3} \\ 120 & 25 \\ 105 & 20 \end{array}}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$\text{ALT} = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

- n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;
 d adalah pengenceran pertama yang dihitung.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131+143+30+25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
 - jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640\,000 (6,4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
 area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area(cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\,500\,000 (6,5 \times 10^6)$
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\,900\,000 (5,9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
 f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.8.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
 contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
 contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
 contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
 contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.8.3 Bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli*

A.8.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, sedangkan pertumbuhan bakteri *E. coli* diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.8.3.2 Peralatan

- Inkubator, $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- Rak untuk tabung reaksi;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril, berskala;
- Botol pengencer, terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- Tabung reaksi dan Tabung *Durham*;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- Jarum Ose dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.8.3.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth / *lauryl tryptose* (LT) broth;
- Brilliant green lactose bile* (BGLB) broth 2%;
- Escherichia coli* (EC) broth;
- Agar Levine's eosin methylene blue* (L-EMB);
- Plate count agar* (PCA);
- Gram stain*;
- Tryptone (tryptophane) broth*;
- Pereaksi Kovacs';
- Methyl red – Voges Proskauer* (MR – VP) broth;
- Pereaksi *Voges Proskauer*;
- Larutan merah metil;
- Koser's citrate broth*;
- Peptone diluents* 0,1%;
- Pereaksi indol;
- Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- Butterfield's Phosfat Buffered Dilution Water* (BPB);
- Larutan alfa naftol 5%; dan
- Kristal kreatin.

A.8.3.4 Cara kerja

A.8.3.4.1 APM - Uji pendugaan untuk bakteri *Coliform*

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.8.1.4;
- inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *lauryl sulfate tryptose* (LST) broth yang didalamnya terdapat tabung Durham terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam;
- amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif",

- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan “negatif”, lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut “positif”; dan
- a) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

A.8.3.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *Coliform*

- a) Kocok tabung LST broth yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST broth yang positif ke dalam tabung BGLB broth 2% yang berlainan;
- c) masukkan tabung-tabung BGLB broth 2% ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- d) tentukan APM sesuai dengan Tabel A.2, berdasarkan jumlah tabung BGLB broth yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada 35°C ; dan
- b) laporkan bakteri *Coliform* sebagai APM per gram.

A.8.3.4.3 Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- a) Kocok tabung-tabung EC broth yang positif secara hati-hati;
- b) goreskan/tanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm;
- c) inkubasikan pinggan L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu (35 ± 1) $^\circ\text{C}$;
- d) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam;
- e) dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diduga *E. coli* pada tabung agar miring PCA;
- f) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 35°C dan gunakan untuk uji selanjutnya; dan
- g) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E. coli* adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti di bawah ini, serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST broth untuk menegaskan adanya produksi gas:
 - uji indol
 - Inokulasi tabung *tryptone (tryptophane) broth*;
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs'; dan
 - uji indol adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.
 - uji *Voges Proskauer*
 - Inokulasi tabung medium MR-VP broth dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - pindahkan 1 mL biakan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril;
 - tambahkan 0,6 mL larutan alfa naftol 5% dalam alkohol dan 0,2 ml larutan KOH 40 % serta beberapa butir kristal kreatin; dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji merah metil
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP broth selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung; dan

- uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah dan negatif bila terbentuk warna kuning.
- uji sitrat
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan hati-hati menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain;
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35 °C; dan
 - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
 - uji pembentukan gas dari laktosa
 - Inokulasi tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C; dan
 - amati tabung - tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.8.3.4.4 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 - Reaksi biokimia *Escherichia coli* pada uji IMVIC

<i>Escherichia coli</i>	Indol	Merah metil	Voges <i>Proskauer</i>	Sitrat
Varietas I	+	+	-	-
Varietas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila:
 - Uji IMVIC mengikuti pola ++-- atau -+-- sesuai dengan Tabel A.2.;
 - pewarnaan gram menunjukkan gram negative bentuk batang tidak berspora; dan
 - terbentuknya gas dalam LST broth dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C.
- Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung
 - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 - APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216

Tabel A.2 - (lanjutan)

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

A.8.4 *Salmonella sp*

A.8.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella sp* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella sp*.

A.8.4.2 Peralatan

- Inkubator, $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator*, $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- Otoklaf;
- Oven;
- Neraca, kapasitas 2 000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- Penangas air, $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- pH meter;
- Blender dengan kecepatan putaran 10 000 sampai dengan 12 000 rpm dan blender jar (botol) steril;
- Botol bertutup ulir bermulut lebar 500 mL steril, labu Erlenmeyer 500 mL steril, beaker; 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 mL dan 10 mL dengan ketelitian 0,1 mL;
- Tabung reaksi atau tabung kultur steril, 10 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm;
- Beaker plastik, 4 L, dapat diotoklaf, untuk menyangga kantong plastik selama pengocokan dan inkubasi;
- Rak tabung reaksi atau rak tabung kultur;
- Vorteks mixer*;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran 15 mm x 100 mm) steril;
- Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- Jarum Ose, ujung runcing dan bulat (berukuran diameter 3 mm);
- Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril;
- Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- Fisher* atau *bunsen burner*; dan
- Kertas pH (kisaran pH 6 - 8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna.

A.8.4.3 Pembenihan dan pereaksi

- a) *Lactose broth*;
- b) *Tetrathionate (TT) broth*;
- c) *Rappaport-Vassiliadis (RV) medium* (RV medium harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi RV medium tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) *Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar* (agar XLD);
- e) *Hektoen enteric (HE) agar* (agar HE);
- f) *Bismuth sulfite (BS) agar* (agar BS);
- g) *Triple sugar iron (TSI) agar* (agar TSI);
- h) *Tryptone (atau tryptophane) broth (TB)*;
- i) *Trypticase soy-tryptose broth (TSTB)*;
- j) *Methyl red-Voges Proskeaur (MR-VP) broth*
- k) *Simmons citrate agar* (agar *Simmons citrate*);
- l) *Urea broth*;
- m) *Rapid urea broth*;
- n) *Malonate broth*;
- o) *Lysine iron agar (LIA)* (Edward dan Fife)
- p) *Lysine decarboxylase broth (LDB)*;
- q) *Potassium cyanide (KCN) broth*;
- r) *Phenol red carbohydrate broth* (*Phenol red lactose broth* dan *Phenol red red sucrose broth*) atau *Purple carbohydrate broth* (*Purple lactose broth* dan *Purple sucrose broth*);
- s) *Phenol red dulcitol* atau *Purple broth base* dengan 0,5% *dulcitol*;
- t) *MacConkey agar* (agar *MacConkey*);
- u) *Brain heart infusion (BHI) broth*;
- v) *Tryptose blood agar base*;
- w) Pereaksi Kovacs';
- x) Pereaksi uji *Voges-Proskauer (VP)*;
- y) Kristal keratin fosfat;
- z) Larutan kalium hidroksida (KOH), 40 %;
- aa) Larutan *bromocresol purple dye*, 0,2 %;
- bb) Indikator merah metil;
- cc) Indikator *phenol red* atau *bromocresol purple*;
- dd) Air suling steril;
- ee) Larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);
- ff) Larutan *formanilized physiological saline*;
- gg) *Formanilized antigen*;
- hh) Alfa naftol;
- ii) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*;
- jj) *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*; dan
- kk) *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C1, C2, C3, D1, D2, E1, E2, E3, E4, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai.

A.8.4.4 Cara Kerja

A.8.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh secara aseptis dan tuang secara hati-hati dan perlahan ke dalam 500 mL botol pengencer yang berisi 225 mL *lactose broth* yang steril;
- b) biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup, tanpa diganggu; dan
- c) kendurkan tutup wadah secukupnya $\frac{1}{4}$ putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35°C .

A.8.4.4.2 Pengkayaan

- Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 mL media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *tetrathionate broth* (TT broth) dan vortex masing-masing campuran tersebut; dan
- inkubasikan media RV pada suhu $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi dan TT broth pada $(35 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam.

A.8.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose 3 mm, goreskan biakan pengkayaan TT broth ke dalam cawan petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- inkubasikan cawan-cawan BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
- amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella sp.* setelah inkubasi (24 ± 2) jam; Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella sp.* dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi (24 ± 2) jam.

Morfologi koloni *Salmonella sp.* mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa biakan *Salmonella sp.* memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.

HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

- jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella sp.* pada media BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella sp.* pada media BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut;
- dengan menggunakan jarum Ose ujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media agar miring TSI dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *lysine decarboxylase* sangat anaerobik, agar miring LIA harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu $(5 - 8) ^\circ\text{C}$;
- inkubasi agar miring TSI dan LIA pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H_2S yang berlebihan. Pada TSI, biakan *Salmonella sp.* akan menghasilkan alkalin (merah) pada media agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa memproduksi H_2S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA, biakan *Salmonella sp.* akan menghasilkan reaksi alkalin (ungu) pada tusukan pada tabung agar tegak. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan negatif. Umumnya biakan *Salmonella sp.* membentuk H_2S pada LIA. Beberapa biakan non *Salmonella sp.* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;

- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan di dalam media LIA, tanpa memperhatikan reaksi TSI, akan dianggap sebagai *Salmonella sp* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang menghasilkan asam pada tusukan pada media agar tegak LIA dan alkalin pada agar miring serta reaksi asam pada tusukan pada media agar tegak TSI harus dipertimbangkan juga sebagai *Salmonella sp* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media agar tegak LIA dan asam pada agar miring TSI, serta reaksi asam pada tusukan di media agar tegak TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella sp*. Bila biakan TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella sp*. (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang diduga *Salmonella sp*. dari medium selektif yang tidak memberikan biakan duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA sesuai dengan pasal f di atas; dan
- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
- tiga biakan presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TT *broth*, dan tiga biakan presumtif yang diinokulasikan dari RV;
 - jika tiga biakan presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 biakan TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

A.8.4.4.4 Identifikasi *Salmonella sp*.

A.8.4.4.4.1 Biakan campuran

- a) Apabila biakan agar TSI terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media agar *MacConkey*, HE atau XLD. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C . Amati koloni yang diduga *Salmonella sp*, yaitu:
- Agar *Mac Conkey*. Koloni tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella sp*. akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
 - Agar *Hektoen Enteric* (HE). Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella sp*. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam;
 - Agar *Xylose Lysine desoxycholate* (XLD). Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni yang diduga *Salmonella sp* pada media TSI dan LIA sesuai dengan A.8.4.4.3.f dan lanjutkan sesuai dengan A.8.4.4.3.g.

A.8.4.4.4.2 Biakan murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan koloni yang diduga *Salmonella sp* dari media agar miring TSI dengan jarum ose runcing ke dalam tabung urea broth. Karena kadang-kadang tabung urea broth yang tidak diinokulasi biakan akan berubah warna menjadi merah keunguan (uji positif) maka perlu dibuat tabung urea broth tanpa inokulasi sebagai kontrol. Inkubasikan tabung-tabung tersebut selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
- b) Uji urease (cepat).
Inokulasikan koloni yang diduga *Salmonella sp* dari media agar miring TSI dengan jarum Ose 3mm ke dalam tabung rapid urea broth. Inokulasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Biakan *Salmonella sp*. akan memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna) pada uji urease, walaupun demikian perlu uji lebih lanjut.

A.8.4.4.4.3 Pengujian biakan urease negatif

- a) *Lysine Decarboxylase Broth* (LDB);

Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 Ose koloni yang diduga *Salmonella sp.* dari agar miring TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella sp.* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2% *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.

- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5% dulcitol; dan inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah inkubasi 24 jam. Pada umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *Durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

- c) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);

Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:

- *Potassium Cyanide* (KCN) *broth*

Pindahkan 1 Ose biakan dari TB 24 jam ke dalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat (bila perlu lapisi dengan parafin/lilin). Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella sp.* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.

- *Malonate broth*

Pindahkan 1 Ose dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.

- Uji indol

Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi *Kovacs'*. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif. Nyatakan biakan sebagai bukan *Salmonella sp.* bila reaksi indol positif dan flagellar (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif.

A.8.4.4.4 Uji serologi polyvalent flagellar (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif ke dalam:

- BHI *broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35°C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
- *Trypticase Soy Tryptose broth* (TSTB) dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL biakan di atas.

- b) siapkan 2 biakan dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan $\pm 0,5$ mL larutan saline *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol saline dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized antigen*. Inkubasikan campuran

tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai dengan 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.

- Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
- negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
- non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.8.4.4.5 Uji serologi polyvalent somatic (o)

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,85 % saline menggunakan jarum Ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- d) tambahkan 1 tetes larutan saline pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) antiserum ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji, pada kontrol saline tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol saline;
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol saline.

A.8.4.4.5 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella sp.*, biakan yang memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3 pasal 1 - 11. Jika 1 biakan TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella sp.*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Biakan yang memberikan reaksi positif pada uji serologi flagellar (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella sp* pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai dengan A.8.4.4.4.1 diatas dan uji kembali sesuai dengan A.8.4.4.4.2. Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap biakan yang tidak memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3:

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
 - Inokulasi *broth* ini dengan biakan TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *Durham*. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella sp* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika biakan memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp*, kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;

Ikuti prosedur sesuai dengan A.8.4.4.5.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* pada biakan yang memberikan reaksi positif, kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) *Methyl Red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*;

Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;

Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

- Pindahkan 1 mL MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- Tambahkan 0,6 mL alfa naftol dan aduk;
- Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40% dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
- Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella sp* memberikan reaksi VP negatif.

Uji merah metil (MR)

- Tambahkan 5 tetes indikator merah metil ke dalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
- amati hasilnya dengan segera; dan
- umumnya *Salmonella sp* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp* biakan yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d) Agar *Simmons citrate*.

- Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp* memberikan hasil sitrat positif;
- negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.8.4.4.6 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella sp.* biakan-biakan yang mempunyai reaksi sesuai dengan Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella sp* biakan-biakan yang memberikan reaksi sesuai dengan Tabel A.4. Bila tidak ada 1 biakan TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella sp* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia sesuai dengan A.8.4.4.3 terhadap biakan yang memberikan reaksi *urease* negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp

No	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1	<i>Glucose</i> (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2	<i>Lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3	H ₂ S (TSI dan LIA)	hitam	tidak hitam	+
4	<i>Urease</i>	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5	<i>Lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	Tanpa/tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7	KCN <i>broth</i>	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9	Uji <i>indole</i>	permukaan berwarna nila	Permukaan berwarna kuning	-
10	Uji <i>Polyvalent flagellar</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11	Uji <i>Polyvalen somatic</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12	<i>Phenol red lactose Broth</i>	warna kuning dan/atau gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13	<i>Phenol red sucrose Broth</i>	warna kuning dan/atau gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15	Uji <i>methyl red</i>	merah menyebar	kuning menyebar	+
16	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V
Keterangan: + adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari; - adalah 90 % atau lebih negatif dalam satu atau dua hari; V adalah variabel; ^b adalah mayoritas dari kultur <i>Salmonella arizonae</i> : negatif; ^c adalah mayoritas dari kultur <i>Salmonella arizonae</i> : positif.				

Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella sp*

No	Substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji <i>indole</i> dan <i>polivalent flagellar</i> (H)	positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan <i>KCN broth</i>	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas)a,b
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas)b
6	<i>KCN broth</i> , uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan <i>methyl red</i>	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a adalah test <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella sp</i> , uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella sp</i> .		

A.8.5 *Staphylococcus aureus*

A.8.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulasi.

A.8.5.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Spreader* steril dari gelas;
- Botol pengencer 500 mL;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL;
- Tabung reaksi;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- Jarum Ose.

A.8.5.3 Pembenihan dan pereaksi

- Baird-parker agar* (BPA);
- Brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- Plasma koagulase kelinci.

A.8.5.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.8.1.4;
- pipet 1mL larutan contoh ke dalam 3 cawan petri berisi media BPA berbeda (misalkan 1mL dibagi menjadi 0,3 mL; 0,3 mL; dan 0,4 mL);
- sebar contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh medium (± 10 menit). Jika contoh tidak mudah terserap oleh media, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik;
- inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan

- e) pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung koloni yang diduga sebagai *Staphylococcus aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum Ose.

A.8.5.5 Uji koagulasi

- Pindahkan 5 koloni sampai dengan 10 koloni yang diduga *Staphylococcus aureus* ke dalam tabung berisi 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL BHIB;
- inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- tambahkan plasma koagulase kelinci sebanyak 0,5 mL ke dalam kultur BHIB dan campur;
- inkubasikan campuran plasma koagulase kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam dan kemudian amati terbentuknya gumpalan setiap 6 jam. *Staphylococcus aureus* positif apabila terbentuk gumpalan yang kokoh dan utuh serta dapat bertahan di dalam tabung ketika dibalikkan; dan
- amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu (35 – 37) °C selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi.

A.8.5.6 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terjadi koagulasi, maka hasil dinyatakan “negatif”; dan
- Jika terjadi koagulasi, maka hasil dinyatakan “positif”.

A.8.7 Kapang dan Khamir

A.8.6.7.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu (25 ± 1) °C selama 5 hari.

A.8.7.2 Peralatan

- Inkubator (25 ± 1) °C terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air, (45 ± 1) °C;
- pH meter
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- Bent glass rod*.

A.8.7.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- Agar *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC);
- Agar *dichloran* 18% *glycerol* (DG 18);
- Larutan pepton 0,1%;

- pepton	1 g
- air suling	1 000 mL

 larutkan pepton dalam air suling kemudian sterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, dan atur pH sehingga mencapai pH akhir (7,0 ± 0,2).
- Larutan antibiotik.
Antibiotik ditambahkan dalam media kapang untuk mencegah pertumbuhan bakteri.

Chloramphenicol adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil selama proses dalam otoklaf. Konsentrasi antibiotik yang dianjurkan adalah 100 mg/L media. Jika terlihat pertumbuhan bakteri berlebihan, siapkan media dengan penambahan *chloramphenicol* 50 mg/L sebelum otoklaf dan *chlortetracycline* 50 mg/L steril saat media mulai dikondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.8.7.4 Persiapan dan homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptis kedalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pepton 0,1% steril sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10; dan
- Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.8.7.5 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} dengan menggunakan larutan pepton 0,1 %;
- persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan salah satu metode di bawah ini, yaitu :
 - metode sebar (media DRBC atau DG 18), penggunaan media DG 18 lebih sesuai untuk contoh uji yang mempunyai aw kurang dari 0,95: pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebarkan merata dengan menggunakan *bent glass rod*.
 - metode tuang (media DG 18):
 - pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media;
 - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit;
 - biarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat.
- masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- hitung koloni kapang setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam; dan
- nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang per gram contoh.

A.8.7.6 Pernyataan hasil

A.8.7.6.1 Cara menghitung

Hitung koloni kapang sesuai dengan A.8.2.6.1 untuk cawan yang berisi 10 koloni sampai dengan 150 koloni.

A.8.7.6.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan kapang sesuai dengan A.8.2.6.2

Bibliografi

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 920.57 Alcohol in Wines*, 18th Edition, Chapter 28.1.04

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 958.04 Methanol in Distilled Liquors*, 18th Edition, Chapter 26.1.34

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in human dan Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11 Determination of lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.09

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 962.12, Acidity (Titratable) of Wines*, 18th Edition, Chapter 28.1.29

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Yeast. Molds. And Mycotoxins*. Chapter 18.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Salmonella*. Chapter 5.

SNI 7387:2009. *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan*.

SNI 7388:2009. *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan*.